基于 TaqMan 探针的蜜蜂囊状幼虫病病毒荧光 PCR 检测方法的建立和应用

宋战昀[1]，王振国[1,*]，冯　新[2]，刘金华[1]，魏春艳[1]，蔡　阳[1]，孟庆峰[1]，周　亮[3]
（1. 吉林出入境检验检疫局，长春 130062；2. 吉林大学畜牧兽医学院，长春 130062；3. 吉林农业大学，长春 130062）

摘要：为建立快速有效的蜜蜂囊状幼虫病检疫方法，依据 TaqMan 荧光标记探针技术原理，针对蜜蜂囊状幼虫病病毒保守序列，设计出一对特异性引物和一条探针，建立了一种快速检测蜜蜂囊状幼虫病病毒的荧光 PCR 方法。该方法对蜜蜂囊状幼虫病的检测具有较好的特异性，与蜜蜂急性麻痹病病毒、蜜蜂慢性麻痹病病毒、蜜蜂残翼病病毒和黑蜂王台病病毒之间均无交叉反应。检测灵敏度可达 1.0×10^2 拷贝/μL 阳性质粒，可对低病毒含量的样品进行准确检测。重复性和稳定性试验结果显示，变异系数为 1.6%，说明该方法具有较好的重复性和稳定性。应用该方法对蜜蜂及蜂制品进行检测，结果显示所建立的荧光 PCR 检测方法 4 h 内即可报告检测结果，该方法具有快速、灵敏、特异及重复性好等优点，适用于蜜蜂及其制品中蜜蜂囊状幼虫病病毒的快速检疫。

关键词：蜜蜂；囊状幼虫病病毒；TaqMan 探针；荧光 PCR 检测；检疫
中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)08-0920-06

A real-time TaqMan PCR assay to detect sacbrood virus in honeybee and honeybee products

SONG Zhan-Yun[1], WANG Zhen-Guo[1,*], FENG Xin[2], LIU Jin-Hua[1], WEI Chun-Yan[1], CAI Yang[1], MENG Qing-Feng[1], ZHOU Liang[3] (1. Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Changchun 130062, China; 2. Animal Science and Veterinary College, Jilin University, Changchun 130062, China; 3. Jilin Agricultural University, Changchun 130062, China)

Abstract: To establish a rapid and effective quarantine method of the honeybee sacbrood virus disease, we developed a real-time RT-PCR assay for detection of bee sacbrood disease using TaqMan probes. A pair of specific primers and a probe used in this assay were designed based on a highly conserved region in sacbrood bee virus. The assay was shown to be sensitive, detecting less than 1.0×10^2 copies/μL, and specific for the detection of sacbrood bee virus. Cross-reaction with acute bee paralysis virus, deformed wing virus and black queen cell virus was not observed. The coefficient of variation in the stability experiments was 1.6%. A reliable diagnostic result can be obtained just within 4 h. The assay proved to be a rapid, sensitive, specific and repetitive method for rapid detection of sacbrood bee virus from honeybee and honeybee products in quarantine.

Key words: Honeybee; sacbrood virus (SBV); TaqMan probe; real-time PCR; quarantine

蜜蜂囊状幼虫病(sacbrood disease)是由蜜蜂囊状幼虫病病毒(sacbrood virus, SBV)引起的一种对蜜蜂危害严重的病毒病。其症状主要见于蜜蜂幼虫，病毒在幼虫体内大量复制，导致幼虫很快死亡，由于虫体皮下渗出液增多，用镊子夹出时呈现典型的囊状，因此得名。该病最早在 1913 年发现，但直到 1964 年才证实其病原体为 SBV(Bailey *et al*., 1964)。目前该病已是世界范围普遍发生的一种蜜蜂病毒病。SBV 是类小核糖核酸病毒(picornavirus)，属于正链 RNA 病毒，病毒粒子直径 28 nm，无囊膜，圆形(Moore *et al*., 1985)。

蜜蜂囊状幼虫病过去主要在西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 中发生，1971 年在我国的中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* F. 和亚洲其他国家的东方蜜蜂 *Apis cerana* F. 中先后暴发，疫情首先在广东省佛冈、从化、增城等地发生，造成了巨大损失(杨冠煌等,

基金项目：国家质检总局科学基金资助项目(2005IK052)
作者简介：宋战昀，男，1976 年生，山东荣成人，博士，兽医师，主要从事动物检疫工作，E-mail：zhanyun-song@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：wangzg@jlciq.gov.cn
收稿日期 Received：2010-01-25；接受日期 Accepted：2010-07-04

1979)。近年来，该病在我国也时常发生(许益鹏等，1979；胡箭卫等，2009)，它多流行于夏秋高温季节，其危害大、传播快，蜂群患病后轻者影响蜂群的繁殖和采集，重者会造成全场蜂群覆灭(Welch *et al.*，2009)。当发现蜂群内有感染症状时，已经对蜂群造成了很大的危害，随后的防治措施难以弥补已造成的巨大损失，因此，蜜蜂囊状幼虫病的防治重在如何及早发现病毒的感染。在病毒的检测方面，传统病毒的分离和形态观测需要繁琐的步骤和较高的试验条件。随着分子生物学的发展，使得利用生物技术进行 SBV 的检测成为可能。本文的目的是建立一种快速检测 SBV 的荧光 PCR 方法，为我国蜜蜂囊状幼虫病的诊断、防治、检疫以及蜂产品病原污染检测提供快速、准确、简便的检测方法，为有效控制蜜蜂囊状幼虫病的传播、降低蜂蜜中药物残留以及提高蜂产品质量提供技术保障。

1　材料与方法

1.1　病毒及病料

蜜蜂囊状幼虫病病料、蜜蜂急性麻痹病病料、蜜蜂慢性麻痹病病料、蜜蜂残翼病病料、黑蜂王台病病料来自吉林省和辽宁省不同地区 40 个蜂场。蜜蜂、花粉颗粒、蜂胶和蜂王浆等蜂产品购自长春市某蜂产品专卖店。

1.2　仪器和试剂

高速冷冻离心机(SIGMA 3K30，德国西格马公司)，PCR 扩增仪(Biometra Tgradient-96，德国 Biometra 公司)，荧光定量 PCR 扩增仪(ABI Sequence Detection System 7000)。RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、TaqHS DNA 聚合酶、dNTP、pMD18-T、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α、凝胶回收试剂盒等购自大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司。

1.3　引物设计与合成

根据 GenBank 网站公布的蜜蜂囊状幼虫病病毒全基因组核苷酸序列(GenBank 登录号：AF092924)，用 Primer Express 2.0 软件设计出上游引物：5′-AAGTTGGAGGCGCGTAATTG-3′和下游引物：5′-AAATGTCTTCTTACTAGAGGTAAGGATTG-3′，探针：5′-FAMCGGAGTGGAAAGATTATCTACAATCCTTACCTCTA-3′。探针的荧光标记选择 FAM 作为报告发光基团，TAMRA 为淬灭基团，上述引物和探针由大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司合成。

1.4　病毒 RNA 的提取

病毒 RNA 的提取按照 TaKaRa 公司 RNA 提取试剂盒操作说明书进行。病毒样品 RNA 提取的起始量为 1～2 头患病蜜蜂虫体，提取的 RNA 溶于 20 μL DEPC 处理过的双蒸水中。

1.5　标准阳性模板的制备

提取好的病毒 RNA 样品按 RT-PCR 试剂盒的操作说明书建立反应体系，混匀后开始 cDNA 链的合成以及后续的 PCR 扩增过程。具体的反转录和 PCR 扩增条件：首先 65℃反应 10 min，42℃反应 90 min，最后 99℃反应 5 min，完成反转录过程，然后开始 PCR 扩增，条件为 94℃变性 2 min，94℃变性 30 s，55℃复性 30 s，72℃延伸 40 s，共计 35 个循环，最后 72℃延伸 10 min，结束后置于 4℃保存。取 50 μL RT-PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳，切下含目的条带的凝胶，用凝胶回收试剂盒回收目的片段，与 pMD18-T 载体连接，将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，挑选阳性克隆，提取质粒经测序分析正确的命名为 pMD-sbv。

1.6　实时荧光 PCR 检测体系的建立和优化

反应体系为 25 μL：10×缓冲液 2.5 μL，TaqHS DNA 聚合酶 2 U，上下游引物和标记探针各 1 μL，dNTP 2 μL，cDNA 3 μL，以去离子水补足25 μL。在 ABI 7000 型荧光定量扩增仪上进行扩增。反应条件为 94℃ 5 min，93℃ 40 s，55℃ 40 s，72℃ 40 s，共40 个循环。应用质粒 pMD-sbv 作为检测样品，对荧光定量 PCR 反应体系中各组分浓度和反应程序进行优化，特别是对引物和探针浓度进行筛选，以获得最低的 C_T 值和较高的荧光强度增加值(ΔRn)。选用 0.4 μmol/L，0.6 μmol/L，0.8 μmol/L，1.0 μmol/L 的引物终浓度和0.4 μmol/L，0.6 μmol/L 的探针终浓度，采用矩阵法筛选引物和探针的最佳浓度。

1.7　敏感性、特异性试验

将含目的基因的质粒 pMD-sbv 10 倍系列稀释，分析得出荧光定量 PCR 所能检出的最低模板拷贝数。

为了验证本检测方法的特异性，以常规方法提取的各病原核酸(蜜蜂急性麻痹病病毒、蜜蜂慢性麻痹病病毒、蜜蜂残翼病病毒、黑蜂王台病病毒)为模板检测本方法的特异性。

1.8　重复性和稳定性试验

选用 3 个浓度的 pMD-sbv 质粒(1.0×10^5拷贝/μL、1.0×10^6拷贝/μL、1.0×10^7拷贝/μL)进行 3 次重复试验，通过对 C_T 值进行统计学比较分析，计算它们的变异系数来评估本方法的重复性和稳定性。

1.9　样品检测结果

应用所建立的荧光 PCR 方法，对本局自 2005 年收集的来自吉林省和辽宁省不同地区 40 个蜂场的阳性及疑似阳性病料进行检测；同时，将阳性患病幼虫虫体匀浆后，以不同稀释倍数添加入蜜蜂、花粉颗粒、蜂胶和蜂王浆中作为模拟样品进行检测。

2 结果

2.1 荧光 PCR 反应条件优化结果

用优化的反应体系进行引物、探针比例的矩阵优化，结果如图 1 所示，当用 55℃退火，上下游引物终浓度均为 0.8 μmol/L，探针终浓度为 0.6 μmol/L时，能够获得较小的 C_T 值及最大的 ΔRn，扩增曲线明显，扩增效果最好。

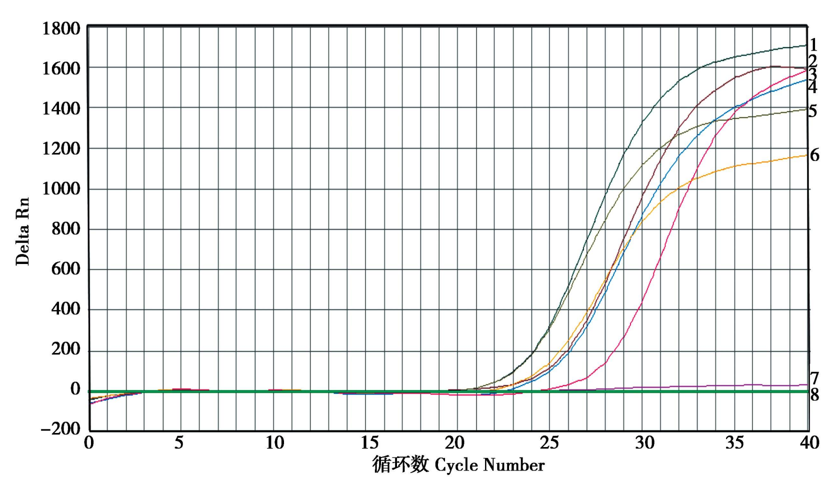


图 1 引物和探针的不同配比终浓度时的扩增曲线

Fig. 1 Amplification curve of different mixing concentrations of primer and probe

1：引物浓度 Primer concentration：0.8 μmol/L，探针浓度 Probe concentration：0.6 μmol/L；2：引物浓度 Primer concentration：1.0 μmol/L，探针浓度 Probe concentration：0.6 μmol/L；3：引物浓度 Primer concentration：1.0 μmol/L，探针浓度 Probe concentration：0.4 μmol/L；4：引物浓度 Primer concentration：0.8 μmol/L，探针浓度 Probe concentration：0.4 μmol/L；5：引物浓度 Primer concentration：0.6 μmol/L，探针浓度 Probe concentration：0.6 μmol/L；6：引物浓度 Primer concentration：0.6 μmol/L，探针浓度 Probe concentration：0.4 μmol/L；7：引物浓度 Primer concentration：0.4 μmol/L，探针浓度 Probe concentration：0.6 μmol/L；8：引物浓度 Primer concentration：0.4 μmol/L，探针浓度 Probe concentration：0.4 μmol/L.

2.2 特异性试验结果

将提取的各病原(蜜蜂囊状幼虫病病毒、蜜蜂急性麻痹病病毒、蜜蜂慢性麻痹病病毒、蜜蜂残翼病病毒、黑蜂王台病病毒)的核酸用优化的反应体系和反应条件进行荧光实时 PCR 检测，结果如图 2 所示，可以看出所建立的方法可以很好地扩增蜜蜂囊状幼虫病病毒，而其他病原体的曲线是平的，可判为阴性。因此，所建立的荧光定量 PCR 方法具有较好的特异性。

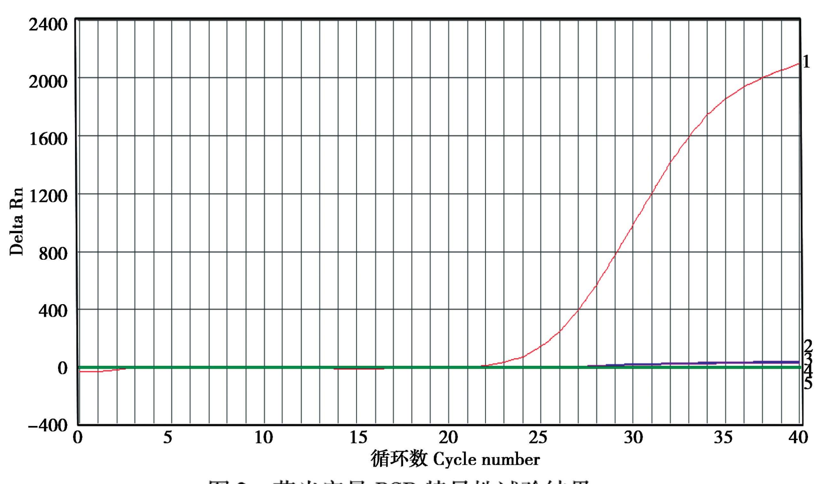


图 2 荧光定量 PCR 特异性试验结果

Fig. 2 The curve of specificity test of fluorescence quantitative PCR

1：蜜蜂囊状幼虫病病毒 Sacbrood virus；2：蜜蜂急性麻痹病病毒 Acute bee paralysis virus；3：蜜蜂慢性麻痹病病毒 Chronic bee paralysis virus；4：蜜蜂残翼病病毒 Deformed wing virus；5：黑蜂王台病病毒 Black queen cell virus.

2.3　敏感性试验结果

将含目的基因的质粒 pMD-sbv 10 倍系列稀释，用优化好的反应体系和反应条件进行试验，如图 3 所示，所建立的荧光 PCR 方法能检出的最低拷贝数为 1.0×10^2 拷贝/μL。

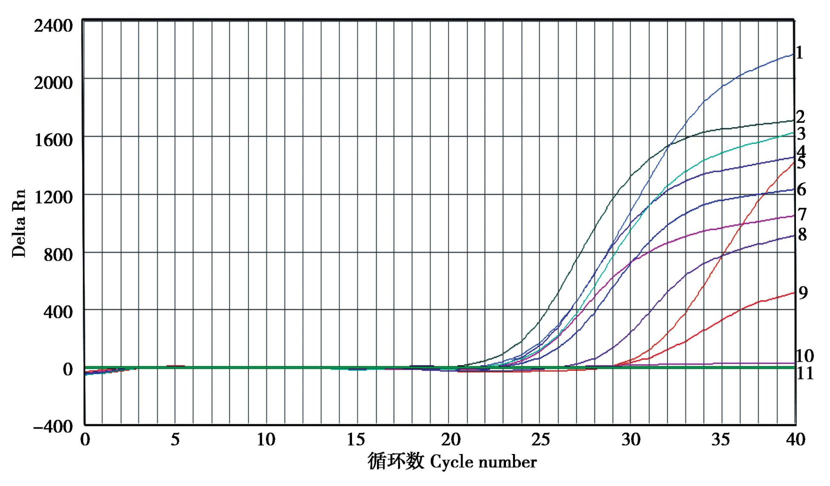


图 3　荧光定量 PCR 敏感性试验结果

Fig. 3　The curve of sensibility test of fluorescence quantitative PCR

1：1.0×10^8 拷贝/μL（1.0×10^8 copies/μL）；2：1.0×10^{10} 拷贝/μL（1.0×10^{10} copies/μL）；3：1.0×10^9 拷贝/μL（1.0×10^9 copies/μL）；4：1.0×10^7 拷贝/μL（1.0×10^7 copies/μL）；5：1.0×10^4 拷贝/μL（1.0×10^4 copies/μL）；6：1.0×10^6 拷贝/μL（1.0×10^6 copies/μL）；7：1.0×10^5 拷贝/μL（1.0×10^5 copies/μL）；8：1.0×10^3 拷贝/μL（1.0×10^3 copies/μL）；9：1.0×10^2 拷贝/μL（1.0×10^2 copies/μL）；10：1.0×10^1 拷贝/μL（1.0×10^1 copies/μL）；11：1.0×10^0 拷贝/μL（1.0×10^0 copies/μL）.

2.4　重复性和稳定性试验结果

用 3 个浓度的 pMD-sbv 质粒（1.0×10^5 拷贝/μL、1.0×10^6 拷贝/μL、1.0×10^7 拷贝/μL）进行检测，每个梯度 3 个重复，结果表明 C_T 值的变异系数小于 1.6%，说明该方法具有较好的重复性和稳定性，结果见表 1。

表 1　不同浓度梯度质粒 pMD-sbv 检测时 C_T 值结果

Table 1　C_T value in different concentrations of plasmid pMD-sbv

	浓度（拷贝/μL）Concentration（copies/μL）		
	1.0×10^5	1.0×10^6	1.0×10^7
C_T 值 C_T value	33.26	30.16	26.48
	33.40	30.47	25.73
	34.44	30.38	26.32
变异系数（%）CV value	0.5	1.1	1.6

2.5　模拟样品检测结果

应用所建立的荧光 PCR 检测方法，对正常的蜜蜂阳性和疑似阳性病料进行检测，同时对模拟样品进行检测，结果如图 4 所示，蜜蜂、花粉颗粒、蜂胶和蜂王浆中添加阳性的患病幼虫，匀浆虫体后，也均能检出阳性，说明本方法完全适用于对蜜蜂制品中 SBV 的检测，只是前处理中核酸提取过程稍有变化。

3　讨论

蜜蜂疾病是影响养蜂生产发展的障碍，也是影响蜂产品产量和质量的重要因素。原因之一是患病蜜蜂死亡直接影响蜂群的生产能力，降低蜂产品产量；原因之二是在防治蜜蜂疾病过程中由于用药不当，造成药物对蜂产品的污染，影响其质量。在现代养蜂生产中，这两方面因素普遍存在（冯峰和魏华珍，2007）。因此，在蜜蜂保护和蜜蜂疾病防治中，要安全控制蜜蜂疾病，提高蜂产品质量，必须综合防治蜜蜂疾病。

SBV 对外界不良环境的抵抗力不强，在 59℃ 热水中只能生存 10 min，在室温干燥情况下可以存活 3 星期，在病虫尸体中可以存活 1 个月，如果病虫尸体腐败只能存活 7～10 d。据资料报道，在蜂粮中可存活 100～120 d，残留在巢房壁上的病毒夏季能存活 80～90 d，冬天则可存活 90～100 d，阳光直射 4～7 h 即可被杀死。1999 年，Ghosh 等率先完成了对 SBV 全基因组测序工作，这也是第一个被测定的蜜蜂病毒全基因组序列，为该病的分子诊断技术奠定了基础；2001 年，Grabensteiner 等建立了RT-PCR诊断方法；近年来，许多分子生物学诊断

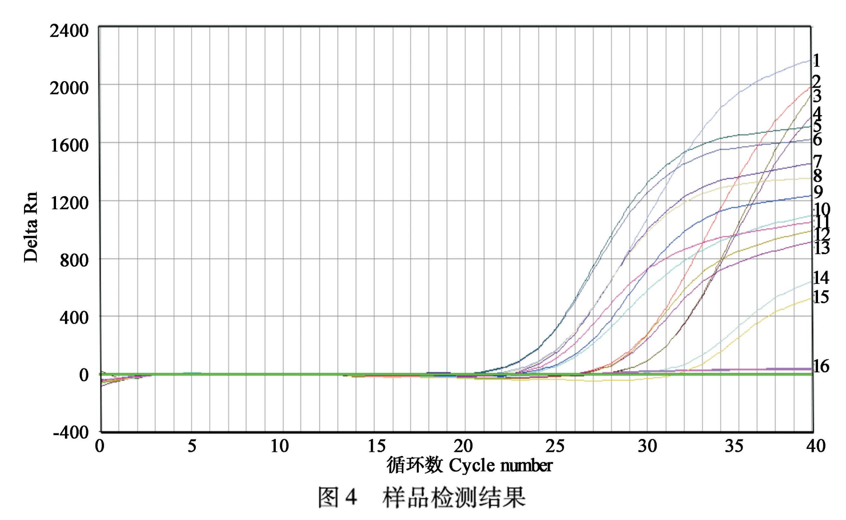


图 4 样品检测结果

Fig. 4 Sample diagnostic results

1, 3, 6, 13: 蜜蜂样品 Honeybee samples; 2, 7, 11, 14: 花粉样品 Pollen samples; 5, 8, 10, 15: 蜂胶样品 Honeybee propolis samples; 4, 9, 12: 蜂王浆样品 Royal jelly samples; 16: 空白对照 Blank control.

方法被用于快速检测 SBV 及其他蜜蜂疫病(Kukielka and Sánchez-Vizcaíno, 2009; Welch *et al.*, 2009)。

本研究建立了 SBV 特异的荧光 PCR 检测方法，检测试验表明，该方法的特异性、敏感性、稳定性等技术指标均能够满足临床检测要求。本研究所应用的引物和探针是根据 SBV 保守序列设计的，检测灵敏度达到可扩增 1.0×10^2 拷贝/μL 阳性质粒，与常规的 PCR 检测相比，敏感性有较大提高(许益鹏等, 2007; 李明等, 2008)，因此，该方法适用于蜜蜂囊状幼虫病病毒早期感染发生时的低病毒含量样品的检测，同时，也适用于蜜蜂制品中蜜蜂囊状幼虫病病毒污染的检测。使用本方法对蜜蜂急性麻痹病病毒、蜜蜂残翼病病毒、黑蜂王台病病毒的检测结果呈阴性，无交叉反应。荧光 PCR 检测时间仅需约2 h，检测全过程包括样品前处理可在 1 个工作日内完成，适合用于临床快速诊断。本文所建立的荧光 PCR 快速检测方法对模拟样品的检测结果显示，该方法不仅适用于患病蜜蜂的检测，同时也适用于蜂蜜、花粉、蜂胶和蜂王浆等蜂制品中 SBV 的检测。该方法不仅为蜜蜂及相关蜂制品的出入境检疫提供了快速检疫依据，同时为临床快速确诊蜜蜂囊状幼虫病，及早对症治疗，减少因用药不当造成的兽药残留超标提供技术支持。

致谢 承蒙吉林省蜜蜂研究所牛庆生研究员以及锦州医学院马鸣啸博士提供蜜蜂病料，在此表示感谢。

参 考 文 献 (References)

Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD, 1964. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 23: 425 – 429.

Feng F, Wei HZ, 2007. Controlling apian diseases to improve quality of bee product. *Apiculture of China*, 9: 22. [冯峰, 魏华珍, 2007. 安全控制蜜蜂疾病提高蜂产品质量. 中国蜂业, 9: 22]

Ghosh RC, Ball BV, Willcocks MM, Carter MJ, 1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *Journal of General Virology*, 80: 1541 – 1549.

Grabensteiner E, Ritter W, Carter MJ, Davison S, Pechhacker H, Kolodziejek J, Boecking O, Derakhshifar I, Moosbeckhofer R, Licek E, Nowotny N, 2001. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8: 93 – 104.

Hu JW, Xi JP, Li XT, 2009. The investigation of Chinese bee sacbrood in Gansu. *Apiculture of China*, 60: 23 – 24. [胡箭卫, 席景平, 李旭涛, 2009. 甘肃中蜂囊状幼虫病的调查. 中国蜂业, 60: 23 – 24].

Kukielka D, Sánchez-Vizcaíno JM, 2009. One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and acute bee paralysis viruses. *J. Virol. Methods*, 161: 240 – 246.

Li M, Ma MX, Zhang YB, Su YH, Qu ZY, Zhou CY, Zhang DL, 2008. RT-PCR detection of Chinese bee sacbrood in Liaoning. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 12: 26 – 27. [李明, 马鸣潇, 张铁博, 苏玉虹, 曲祖乙, 周晨阳, 张大利, 2008. 辽宁地区中华蜜蜂囊状幼虫病的 RT-PCR 检测. 畜牧兽医科技信息, 12: 26 – 27]

Moore NF, Reavy B, King LA, 1985. General characteristics, gene organization and expression of small RNA viruses of insects. *J. Gen. Virol.*, 66: 647 – 659.

Welch A, Drummond F, Tewari S, Averill A, Burand JP, 2009.

Presence and prevalence of viruses in local and migratory honeybees (*Apis mellifera*) in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 7862 – 7865.

Xu YP, Zhang YQ, Li JH, Xing LP, Zhang CX, 2007. Nest-PCR detection for the honey bee sacbrood virus disease. *Bulletin of Science and Technology*, 11: 824 – 827. [许益鹏，章奕卿，李江红，邢丽萍，张传溪，2007. 蜜蜂囊状幼虫病毒病的 Nest-PCR 检测. 科技通报，11: 824 – 827]

Yang GH, Zhang GZ, Du ZL, 1979. Identification of pathogen of sacbrood disease in Chinese honeybees. *Apiculture of China*, 5: 17 – 18. [杨冠煌，张弓召，杜芝兰，1979. 中蜂囊状幼虫病病原鉴定. 中国养蜂，5: 17 – 18]

（责任编辑：袁德成）